

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES CARACTÈRES ANTIGÉNIQUES DES MYCOBACTÉRIES ATYPIQUES

THÈSE

PRESENTÉE

A LA FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 21 DÉCEMBRE 1962

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MEDECINE

PAR

DEMAY DE GOUSTINE François

Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Né le 4 Mai 1936 à CHARTRES (Eure et Loir)



IMPRIMERIE JANODY
23 Cours Docteur-Long
LYON

1962

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DES CARACTERES ANTIGENIQUES
DES MYCOBACTERIES ATYPIQUES

PERSONNEL DE LA FACULTE

M. J. LEPINE : Doyen Honoraire ; M. H. HERMANN : Doyen, Correspondant de l'Institut
M. M. LEVRAT, Assesseur L. REVOL, Assesseur

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN,
GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY DUCLOS, GUILLEMINET

PROFESSEURS

Physiologie A	MM. HERMANN
Clinique urologique	CIBERT
Physique biologique	PONTHUS (dét. à Beyrouth)
Clinique Neuro-Psychiatrique et Hygiène mentale	DECHAUME
Thérapeutique Chirurgicale et Chirurgie Opératoire	ROCHET
Chimie Organique et Toxicologie	CHAMBON
Clinique Chirurgicale B	WERTHEIMER
Clinique Médicale B	PAUPERT-RAVAULT
Clinique et Prophylaxie Cardio-Vasculaires	FROMENT
Clinique Médicale C	CROIZAT
Chimie biologique et médicale	ENSELME
Clinique Chirurgicale A	MALLET-GUY
Pharmacie Galénique et Matière Médicale	REVOL
Clinique Gynécologique	POLLOSSON
Clinique Obstétricale	PIGEAUD
Médecine du Travail	BOURRET
Clinique Médicale A	LEVRAT
Hygiène et Action sanitaire et sociale	SOHIER
Clinique Médicale infantile et Hygiène du premier âge	BERNHEIM
Biologie médicale et Pharmacodynamie	JOURDAN
Botanique et Cryptogamie	NETIEN
Clinique Chirurgicale C	BERTRAND
Chimie Analytique Pharmaceutique	BADINAND
Pharmacie chimique et Pharmacologie	DREVON
Médecine Légale et Déontologie	ROCHE
Parasitologie et Pathologie Exotique	COUDERT
Clinique d'Oto-rhino-laryngologie et d'Audio-Phonologie	MOUNIER-KUHN
Clinique Ophtalmologique	PAUFIQUE
Clinique de Dermatologie, Syphiligraphie et Allergologie	THIERS
Clinique de Pneumo-Phtisiologie	BRUN
Clinique Traumatologique des Membres	CREYSSEL Jean
Cancérologie	DARGENT
Anatomie Pathologique	GUICHARD
Pathologie Générale et Expérimentale	GIRARD Paul
Anatomie	LATARJET
Pathologie Chirurgicale	PEYCELON
Thérapeutique	GIRARD Marcel
Pathologie Médicale	VACHON
Physio-Pathologie des Voies respiratoires	GALY
Radiologie	PAPILLON
Clinique des Maladies Infectieuses	JEUNE
Hydrologie thérapeutique, Climatologie et Ecologie sociale	GONIN
Bactériologie	MONNET
Physiologie et Pathologie obstétricales	BANSSILLON
Physiologie B	CHATONNET
Clinique des maladies endocrinologiques	GUINET Paul
Clinique de Chirurgie Orthopédique	TRILLAT
Clinique stomatologique	FREIDEL
Histologie	X...

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Physique nucléaire appliquée	MM. BERGER	Physiologie	CIER J.-François
à la Médecine	DORCHE	Bactériologie	BERTOYE
Technologie Pharmaceutique			

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Chimie organique et	MM. PERROT	Pharmacie chimique et	CIER André
Toxicologie		Pharmacologie	ROMAN
		Parasitologie	

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Médecine	MM.	Anatomie pathologique	TOMMASI Michel
Anatomie patholog.	FEROLDI Jacques	Hygiène	RIFFAT Georges
Chimie biol. et méd.	CREYSSEL Roger	Pathologie expérim.	JOUVET Michel
Anatomie	DUROUX Emile	Hématologie	FAVRE-GILLY Jean
Thérapeutique	BRETTE René	Pharmacie	MM.
Histologie	DUMONT Louis	Bot. et cryptogamie	ODDOUX Lucien
Hygiène	THIVOLET Jean	Chimie analytique	MALLEIN René
Parasitologie	GARIN Jean-Paul	Chimie biologique	GRAS Jean
Physique	MORET Robert	Physique	PEYRIN Jean-Oliv
Anatomie	BOUCHET Alain		

AGREGES EN EXERCICE

Médecine générale ..	PONT Maurice	Médecine légale ...	COLIN Marcel
Médecine générale ..	VIGNON Georges	Médecine du travail ..	TOLOT François
Médecine générale ..	REVOL Louis	Neuro-psychiatre ..	GUYOTAT Jean
Médecine générale ..	PLAUCHU Marcel	Neuro-psychiatrie ..	SCHOTT Bernard
Médecine générale ..	TRAEGER Jules	Obstétrique	DUMONT Martial
Chirurgie générale ..	MARION Pierre	Ophtalmologie	BONAMOUR Georges
Chirurgie générale ..	MICHAUD Pierre	Urologie	DURAND Louis
Chirurgie générale ..	JAUBERT DE	Médecine générale ..	GARDE Alexandre
	BEAUJEU Michel	Médecine générale ..	PERRIN André
Chirurgie générale ..	SAUTOT Jean	Médecine générale ..	LARBRE François
Chirurgie générale ..	GUILLEMIN Georges	Médecine générale ..	MORNEX René
Obstétrique	BURTHIAULT René	Médecine générale ..	NORMAND Jean
Oto-Rhino-Laryngologie	GIGNOUX Marcel	Chirurgie générale ..	MARET Gilbert
Pédiatrie	FRANÇOIS René	Chirurgie générale ..	DESCOTES Jacques
Médecine générale ..	DEVIC Michel	Electro-radiologie ...	CHASSARD Jean-Louis
Médecine générale ..	DESPIERRES Charles	Neuro-chirurgie	ALLEGRE Georges
Chirurgie générale ..	DE MOURGUES Georges	Ophtalmologie	HUGONNIER René
Chirurgie générale ..	FRANCILLON Jacques	Orthopédie	FAYSSÉ Robert
Chirurgie générale ..	SAUBIER Eugène	Oto-rhino-laryngologie	GAILLARD Jean
Dermatologie	COLOMB Daniel	Pneumo-phtisiologie ..	KALB Jean-Claude

EXAMINATEURS DE LA THESE MM. Pr. P. GIRARD, Président. DESPIERRES, MONNET, GARIN

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES CARACTÈRES ANTIGÉNIQUES DES MYCOBACTÉRIES ATYPIQUES

THÈSE

PRESENTÉE

A LA FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 21 DÉCEMBRE 1962

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MEDECINE

PAR

DEMAY DE GOUSTINE François

Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Né le 4 Mai 1936 à CHARTRES (Eure et Loir)



IMPRIMERIE JANODY
23 Cours Docteur-Long
LYON

—
1962



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MES PARENTS

A MES FRERES

A MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur Paul GIRARD

Professeur de pathologie générale et expérimentale

Il nous a fait l'honneur d'accepter de présider notre thèse.

Qu'il veuille bien recevoir l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

Nous les remercions de l'honneur qu'ils ont bien voulu nous faire en acceptant de nous juger.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur Agrégé MONNET

Monsieur le Professeur Agrégé DESPIERRES

Monsieur le Professeur Agrégé GARIN

Nous les remercions de l'honneur
qu'ils ont bien voulu nous faire en
acceptant de nous juger.

A Monsieur le Docteur J. VIALLIER

*Chef du service des Mycobactériacées
à l'Institut Pasteur de Lyon*

Il a bien voulu nous confier le sujet de cette thèse, et nous a guidé à chaque instant dans l'élaboration de ce travail, en nous accueillant toujours avec la plus grande bienveillance.

Ou'il veuille bien trouver ici l'expression de notre vive gratitude et de notre respectueux attachement.

A Monsieur le Médecin Général BORON

*Agrégé du Val-de-Grâce
Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
et de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

A Monsieur le Médecin Colonel CAMELIN

*Agrégé du Val-de-Grâce
Médecin-chef de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

A NOS MAITRES DE LA FACULTE DE MEDECINE
ET DES HOPITAUX DE LYON
ET DE L'HOPITAL MILITAIRE DES GENETTES

A Monsieur le Médecin Lieutenant-Colonel MAITRE

*Médecin spécialiste des Hôpitaux Militaires
Chef du Laboratoire de Bactériologie et du Service
des Contagieux de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

A Monsieur le Médecin Commandant GIRARD

*Médecin spécialiste des Hôpitaux Militaires
Chef du Service de Dermatologie de l'Hôpital Militaire
d'Instruction Desgenettes*

A Mademoiselle R.-M. CAYRE

*Technicienne au laboratoire des Mycobactériacées
de l'Institut Pasteur*

A TOUS CEUX QUI ONT CONTRIBUE
A L'ELABORATION TECHNIQUE DE CE TRAVAIL

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION

1. Définition des *Mycobactéries*

Le genre *Mycobacterium* est l'un des plus importants de la bactériologie : il comprend en effet les germes qui sont parmi les plus célèbres du monde des infiniments petits, tant par les maladies dont ils sont la cause, que par le nombre de travaux qu'ils ont provoqués : bacille de la tuberculose de l'homme et des animaux, bacille de la lèpre, bacille de l'entérite hypertrophiante des bovidés, etc...

Mais à côté de cette douzaine de bactéries, il en contient des centaines d'autres, isolées peu à peu depuis 50 ans, fort peu connues en vérité. Ces microbes qui ont embarrassé les bactériologistes qui les ont découverts, se rencontrent partout : dans la terre, dans l'eau, dans le fumier, sur les herbes des champs, dans les matières alimentaires telle que le lait et le beurre, sur la peau d'individus ou d'animaux sains, parfois dans des produits pathologiques (Duffourt A.). Les colonies de certaines sont pigmentées, d'autres ne le sont pas ; de certaines on peut extraire des produits ayant les propriétés voisines de la tuberculine, certaines sont virulentes, d'autres non, mais presque toutes peuvent l'être dans certaines conditions (Hauduroy P.).

2. Historique

Les mycobactéries atypiques qui nous intéressent ici furent découvertes peu après le bacille tuberculeux. En effet, rappelons que c'est en 1882 que Robert Koch isola dans des lésions tuberculeuses un batonnet colorable par le bleu de méthylène ; puis Erlich utilisa la fuschine, enfin zieleh et Neelsen publient en 1882 le procédé employé actuellement conférant le vocable de bacille acido-résistant aux mycobactéries ; à la suite des travaux de Koch, on découvrit d'autres variétés de mycobactéries : les unes saprophytes furent prises pour d'autres variétés de bacille tuberculeux, et d'autres pathogènes prises pour saprophytes ; puis ce sont les individualisations de variétés distinctes : le bacille aviaire en 1885 par Nocard, le bacille bovin en 1901 par T. Smith et Koch, le BCG en 1921.

Entre-temps on suspecta l'existence d'autres espèces ayant même propriété tinctoriale que le bacille de Koch. Dès 1884, Lusk, Zahn, Alvaryz et Tavel découvrent un saprophyte du smegma humain ; en 1887 Borconni et Uffreduzzi isolèrent un germe du lait et du beurre de bovidés ; et en 1897 Piètri et Rabinovitch isolent le butter-bacillus. Suivent le grass-bacillus et le mist-bacillus de Moeller en 1898, le milch-bacillus en 1901 ; ces germes étaient réputés saprophytes et dépourvus de pouvoir pathogène. Mais on découvrit d'autres espèces pathogènes : en 1904, Ophüls isolait un tel germe à partir du pus d'un abcès sous-cutané ; Cobbett, Bruynghe, Laporte, Adant rapportent des observations semblables.

Mais il faut attendre 1946 pour les premières difficultés de diagnostic bactériologique des bacilles acido-résistants : en 1953 Buhler et Pollak découvrent des éléments acido-résistants autres que le bacille de Koch, chez des malades porteurs de tuberculose pulmonaire vraie, et isolent aux U.S.A. des bacilles acido-alcoolo-résistants atypiques, à partir d'affections pulmonaires et ganglionnaires étiquetées tuberculeuses dans 1 % des cas. Timpe et Runyon en 1951, Blattner, Nassau et Hamilton en 1957, Mariani et Bissetti en 1958, Popper et Lorian, Kubin et Krumel relatent tous des observations de pneumopathies, dont l'agent responsable est une mycobactérie atypique. Des observations d'adénites ont également été publiées par Maggou, Kleith et Weed ; Kaplan et Grumbach rapportent

2 cas d'adénite froide survenue chez de jeunes enfants résistants à la chimiothérapie ; Van der Haven a même signalé un cas d'ostéomyélite disséminée (Bettembot, thèse 1961, Lyon).

Ainsi les bactériologistes sont obligés de réviser les critères diagnostics du bacille tuberculeux, et sont dans l'impossibilité de classer méthodiquement ces germes en nom d'espèce, car ils n'ont pas encore de « caractères » bactériologiques précis, comme nous le verrons plus loin ; pour rebaptiser ces germes innominés, il faut les différencier et les classer.

3. Identification par les méthodes directes et classifications

Le diagnostic se présente en deux stades différents :

1° Ne pas confondre les mycobactéries atypiques avec les bacilles tuberculeux ;

2° De quelle mycob. atypique s'agit-il ?

En réalité, ces deux temps se confondent souvent, selon les conditions dans lesquelles se présente le diagnostic. Dans certains cas, une souche, même à l'obscurité de l'étuve, présente une coloration rouge ; mais dans d'autres cas la colonie a le même aspect que le bacille tuberculeux ; certaines, par contre, produisent plus ou moins tardivement une coloration jaune ou rouge, après une photo-induction plus ou moins longue ; mais cela risque de passer inaperçu. Aussi a-t-on proposé une série de tests, qui peuvent être recherchés systématiquement, et qui permettent de distinguer nettement les Mycob. atypiques des bacilles tuberculeux. Parmi ces tests biochimiques, deux sont surtout recherchés actuellement : le test à la Nyacine ou test de Konno, et le test de réduction des nitrates. Ils sont utilisés systématiquement à l'Institut Pasteur de Lyon.

Nous ne voulons pas ici entrer dans les détails des réalisations. Indiquons simplement que toutes les Mycob. atypiques donnent un test à la Nyacine, comme le BCG et le bacille Bovin (Villanove J.-B., thèse 1961), (Viallier J.). Par contre le test de la réduction des nitrates est variable selon les Mycob. à l'isolement ; les Mycob. atypiques donnent un test négatif ; mais il peut être positif parfois, alors que le bacille bovin et le B.C.G. donnent toujours un test négatif (Tacquet, Tison et Macquet, Bettembot). Ces différentes recherches permettent de différencier facilement bacille tuberculeux et bacilles atypi-

ques ; mais il faut essayer si possible de classer ces *Mycob.* atypiques, sinon de leur donner un nom spécifique définitif.

Une première classification qui a permis d'apporter un peu de clarté dans l'étude de ces germes est proposée par Runyon en 1959 : elle repose sur des caractères de culture et de chromogénèse ; il distingue 4 groupes :

Groupe I : Les souches photochromogènes sont celles qui sécrètent, mais uniquement après photo-induction, un pigment jaune ou rouge. Théoriquement au sortir de l'étuve, elles sont dépourvues de pigment et ne l'acquièrent qu'après exposition au rayon lumineux. Lors du premier isolement, la pigmentation n'apparaît que tardivement ; c'est ainsi que les souches, isolées de l'expectoration, de malades atteints de pneumopathie à *mycob.* atypiques, ne se sont pigmentées que longtemps après. Habitues au milieu de culture artificiel qui leur est offert, ces souches accroissent leur capacité de chromogénèse ; et même dans certains cas, les colonies sont déjà colorées au sortir de l'étuve ; et à un examen superficiel, elles pourraient être confondues avec les souches du groupe suivant. Si bien que l'étude de la chromogénèse ne peut se faire de façon correcte que lors du repiquage ultérieur : il faut dès l'ensemencement terminé, disposer les tubes dans un lieu obscur, c'est-à-dire les entourer de plusieurs épaisseurs de papier noir ; car nos étuves permettent une photo-induction suffisante pour laisser apparaître la pigmentation ; et même dans ces conditions, des souches photochromogènes, prélevées dans les viscères de souris infectée donnent quelques colonies d'emblée colorées.

Groupe II : Souches Scotochromogènes : elles sont d'emblée colorées à l'obscurité.

Groupe III : Souches non chromogènes : on y rencontre une série de souches difficiles à classer et très délicates à différencier du bacille de Koch ; ce sont des souches non colorées qui poussent en culture non saillantes, souvent assez grasses. L'insensibilité à l'Isoniazide fait discuter le diagnostic avec les *mycob.* tuberculeuses vraies, devenues INH-résistantes, ayant perdues leur activité pathogène pour le cobaye ; mais elles ont aussi perdu leur activité catalasique, contrairement aux *Mycob.* atypiques.

Groupe IV : Mycobactéries à croissance rapide, pigmentées ou non qui sont en général des saprophytes, et pour lesquelles la température optima est variable et inférieure à 37° C ; ce sont des saprophytes qui sont rares dans l'expectoration et les tubages gastriques.

Cette classification paraît actuellement insuffisante, car elle ne donne pas une classification de genre ni d'espèce.

Une suite de travaux récents lui substitue une classification plus spécifique : elle est basée sur les techniques d'identification directes (Devulder B., thèse, Lille 1962).

A) Mycobactérie tuberculeuses : 2 variétés *hominis* et *bovis* ;

B) Les autres espèces de *Mycob.* qui ne sont en principe pas responsables chez le cobaye ou le lapin, de tuberculose expérimentale du type Villemin ; parmi elles on distingue :

1° *Mycobacterium Kansasii* : caractérisé par sa photochromogénèse, avec quelques variations selon les milieux et les conditions de culture ; c'est essentiellement ce caractère qui permet d'identifier ces souches.

2° *Mycobacterium Avium* : où l'on distingue, outre *mycob. avium* vraie, germe responsable de la tuberculose des oiseaux, et pathogène pour le lapin par inoculation à forte dose I.V., d'autres espèces. Elles sont caractérisées par leur absence de chromogénèse sur les milieux usuels, par leur culture plate et grasse se dissociant aisément ; contrairement à *mycob. avium* vrai, leur culture est assez abondante et rapide, et elles ne sont pathogènes ni pour le lapin ni la poule. Il y a 3 variétés :

— *Mycob. Avium* variété Suis : isolée en pratique vétérinaire de quelques animaux.

— *Mycob. Avium* Cutis ou Ulcerans : isolée de lésions ulcérées chez l'homme.

— *Mycob. Avium* Microti ou bacille murin : isolée du campagnol ; elle a eu son heure de célébrité, lorsqu'on lui attribua un éventuel pouvoir vaccinant contre la tuberculose humaine.

Cette classification a été proposée, étudiée et discutée par Gernez-Rieux, Tacquet et Tison dans la thèse lilloise de Devul-

der. Comme avantages, elle offre une classification précise : un germe donné doit comporter des caractères spécifiques permettant de lui donner un nom ; et pour cette famille de mycob., on retrouve les données générales de toutes les autres familles microbiennes. Il suffit des galeries d'identification avec des milieux différents pour pouvoir étudier d'une façon précise le germe isolé. Pourtant ces caractères d'identification ne sont peut-être pas aussi précis que pour d'autres germes ; et l'on en est encore à rechercher des tests biochimiques permettant une classification plus rigoureuse et moins incertaine. Nous avons vu les difficultés pour la chromogénèse ; or le caractère essentiel du groupe *Kansasii* est justement cette chromogénèse ; on aimerait mieux un test biochimique plus précis et plus facile à mettre en évidence.

3° *Mycobacterium Aquae* : Ici les caractéristiques sont encore plus discutables, car on ne donne pas un nom spécifique mais la rubrique de groupe ou de sous-groupe : il y en a 3. A l'Institut Pasteur de Lyon, dans le Service des Mycobactéries, on a coutume de distinguer les souches du sous-groupe I, qui sont scotochromogènes vraies et dotées d'une activité uréasique importante ; dans le sous-groupe II, l'activité uréasique est inexistante, et la classification des souches y est fort incomplète : si des souches pathogènes pour l'homme, suppuration ganglionnaire ou cutanée, se rangent dans le sous-groupe I à uréase + + +, on rencontre à côté des germes dépourvus de toute activité pathogène. D'autre part, on sait que le groupe *Avium* englobe les souches non chromogènes qui constituaient le groupe de Battey : ainsi il est encore très difficile de donner une classification précise, et toutes ces souches doivent être inoculées à la poule et le pouvoir pathogène ici, doit permettre une classification plus précise.

Enfin, terminons cette classification par six groupes de bacilles à croissance rapide :

- 4° *Mycobacterium Phlei* (grass-bacillus, milch-bacillus).
- 5° » *Smegmatis*, (bacille lacticola, b. d'Alvarez).
- 6° » *Fortuitum*, (*Mycob. Minetti*, *Mycob. Ghiae*).

- | | | |
|----|---|-----------------------------------|
| 7° | » | Thamnopheos, (bacille d'Aronson). |
| 8° | » | Marium, (Mycob. baipei). |
| 9° | » | Pellegrino. |

Les 51 souches étudiées à l'Institut Pasteur de Lyon sont ainsi énumérées selon cette classification :

1° *Mycob. Kansasii* : Quatre souches dont 3 isolées à de multiples exemplaires de 3 sujets affectés de pneumopathies chroniques à mycob. atypiques, lesquelles ont joué un rôle pathogène incontestable en l'absence de tout autre germe.

2° *Mycob. Avium* : Quinze souches, dont aucune ne semble avoir de rôle pathogène ; elles n'ont pas été mises en évidence plusieurs fois dans les mêmes produits pathogènes provenant des mêmes sujets.

3° *Mycob. Acquæ* :

— Type I : 15 souches, dont 2 furent isolées de suppurations cutanées ou ganglionnaires d'enfants ; malheureusement, elles ne purent être retirées une deuxième fois du produit pathologique ; et chez un enfant on nota une allergie tuberculinique transitoire ayant disparue lors de la guérison clinique totale.

— Type II : 16 souches (urée —), toutes retirées de produits pathologiques divers, mais aucune n'a d'activité pathogène.

Pour notre expérimentation, nous avons utilisé les 20 souches suivantes :

— *Mycob. tuberculosis hominis* ;

— 4 souches *Kansasii* : Aba. Fer. Sim. VS. ;

— 3 souches *Avium* : Mil. Far. Her. ;

— 11 souches *Acquæ* :

 Type I : Tyr. Bou. Pay. Mar. ;

 Type II : Cot. Sek. Ley. Esé. Sal. EV40, 932 ;

— 2 souches homogènes : SAPC et Cha. : rappelons qu'il s'agit à l'origine de souches humaines parfaitement identifiées, qui sont transformées par agitation et par culture en eau peptonée glycérinée ; certains admettent qu'il s'agit dès l'origine de souches particulières, qui se sont homogénéisées, et ont poussé en eau peptonée, et qui n'avaient été que des bacilles atypiques isolés de produits pathologiques humains.

Mais il serait utile d'étudier dans cette thèse les caractères antigéniques de ces mycob. atypiques, et de comparer les résultats avec la classification bactériologique actuelle. Ne nous faisant aucun doute sur la complexité du problème et des nombreuses confrontations que cela suppose, nous nous proposons d'apporter seulement, outre des notions bibliographiques, des études effectuées sur des malades et quelques-unes de nos souches, au point de vue de l'allergie et de l'antigénicité sérologique.

Après avoir résumé l'état actuel de nos connaissances sur l'antigénicité des mycobactéries et des méthodes d'étude des caractères antigéniques propre à ces bacilles, nous exposerons notre expérimentation dans ce domaine.

4. Les antigènes des Mycobactéries

Actuellement, pour classer des microbes avec précision, on doit étudier leur structure antigénique. En ce qui concerne les mycobactéries, il faudrait établir la carte de l'antigénicité faisant état des antigènes somatiques et ceux de l'enveloppe. Mais pour les mycobactéries, les études sont beaucoup moins avancées que pour les autres germes.

Nous voudrions évoquer quelques procédés, utilisés pour la mise en évidence des caractères antigéniques des souches, en étudiant d'abord la question de l'allergie de type tuberculinique, puis les réactions sérologiques, enfin quelques données de lysotypie ; au fur et à mesure nous ajouterons quelques expériences personnelles.

CHAPITRE II

L'ALLERGIE DE TYPE TUBERCULINIQUE

On sait que l'état d'allergie tuberculeuse est celui de sensibilisation humorale, provoquée par l'introduction du bacille de Koch dans l'organisme, et que l'on a pris l'habitude de rechercher cet état en explorant la sensibilité de la peau ou du derme avec la tuberculine poison du bacille tuberculeux. Or les mycobactéries atypiques sécrètent dans leur milieu de culture une substance analogue à la tuberculine quant à ses propriétés. Au cours de cette étude, nous ne voulons pas rentrer dans les détails ; nous passerons en revue les différentes expériences démontrant l'activité de ces paratuberculines, envisagée dans le but de pouvoir différencier des espèces mycobactériennes.

1. Les Paratuberculines et leur spécificité

Il existe un très grand nombre de préparations différentes des paratuberculines ; elles sont toutes issues de purifications analogues à la vieille tuberculine de Koch ; elles contiennent donc des exotoxines, une partie des poisons endobacillaires et des éléments microbiens désintégrés.

Déjà en 1922, B. et G. Lange affirmèrent que les bacilles paratuberculeux produisaient des substances analogues à la tuberculine, dont les extraits glycéринés donnent des réactions semblables à celles de la tuberculine chez l'homme et l'animal tuberculeux.

Mais la recherche des paratuberculines implique beaucoup de patience, car elles n'apparaissent que très tardivement, après plus d'un an parfois ; et, autre difficulté, comme le signale Hauduroy, les différents chercheurs n'ont pas toujours eu soin d'indiquer le mode de préparation et l'origine des différents produits, auxquels ils donnent le même nom, et dont l'activité peut être différente.

Voyons les expériences qui ont tenté de rechercher une allergie spécifique, ou qui ont voulu améliorer la spécificité en modifiant soit les paratuberculines, soit l'état de sensibilisation de l'organisme réacteur.

a) *Mise en évidence par la réaction classique d'une allergie croisée entre les Mycobactéries :*

En 1928, Mme Alexa a pu sensibiliser des animaux par le bacille de la fléole : ils présentaient le phénomène de Koch et une allergie tuberculinique homologue au bacille de la fléole et hétérologue au bacille tuberculeux ; inversement des animaux tuberculeux présentaient une allergie hétérologue au mycob. Phlei.

Dans le même ordre d'idées, Saenz et ses coll., Paul et Bocquet, Nègre, puis Bretey et Mme Gerhardt observent que des cobayes non tuberculeux réagissent positivement à la tuberculine, et qu'il est possible d'isoler de leurs organes des bacilles paratuberculeux. Edward et Palmer remarquent qu'un certain nombre de virages de réaction tuberculinique sont en rapport avec une infestation par des germes atypiques ou tuberculeux. Et en 1957, lors d'une étude portant en Inde sur 1.149 personnes et aux Philippines sur 480 écoliers, Edward et Krohn enregistrèrent un fort pourcentage de réactions tuberculiniques peu marquées ; sur des sujets faiblement allergiques ils pratiquèrent des tests cutanés à différents antigènes : tuberculine aviaire, paratuberculine balnei, et d'une souche de Nocardia : les réactions furent de même ordre de grandeur qu'avec la tuberculine humaine ; au contraire les sujets présentant une forte réaction à la tuberculine classique se montraient peu sensibles aux autres antigènes. Une expérience semblable est pratiquée par Fernandez-Ruiz et Delgado-Blanco chez 644 tuberculeux dans l'état de Miranda ; les résultats positifs à la tuberculine sont de 92 %, 28 % à l'Histoplasmine et 2 % à la Coccidioïdine.

En 1957, à l'Ecole Vétérinaire de Lyon (thèse Courtois), Goret pratique des expériences sur la sensibilité à la tuberculine et à la bacilline, d'animaux vaccinés avec une souche avirulente de mycob. de la tortue et d'animaux tuberculeux. L'allergie à la bacilline est plus précoce et plus intense que l'allergie tuberculinique. Mais en 1959, Viallier, Despierre et Mlle Cayré n'ont pas constaté d'allergie tuberculinique chez des cobayes inoculés avec une mycobactérie atypique ; mais elle fut recherchée précocément, et l'inoculation avait été faite à dose relativement minime.

Fricksen et Lauterbach trouvent une réaction tuberculinique positive après administration per orale de mycob. atypiques à des vaux. Beck pratique des tests quantitatifs de sensibilité cutanée avec les fractions protéiniques de 4 souches de Mycob. atypiques et d'autres Mycobactéries : ces tests révèlent aussi une allergie croisée de ces antigènes.

Dans ces expériences, il semble donc bien que les réactions ne soient pas toujours spécifiques, même en dehors de la famille des Mycobactéries. Voyons dans un autre ordre d'idées, comment des auteurs ont tenté d'améliorer la spécificité de cette méthode.

b) *Les améliorations techniques de la méthode et ses résultats :*

Laporte a montré en 1941, que les bacilles paratuberculeux incorporés dans un excipient irrésorbable et inoculés à un organisme provoquaient une allergie plus intense et plus spécifique (procédé de Thomson).

De même, Laporte recommande d'utiliser des paratuberculines très actives : ce qui dépend de l'âge de la culture, et de l'aptitude de la souche mère à présenter des phénomènes d'autolyse révélés par la dégénérescence granuleuse des éléments bacillaires, par la perte de leur acido-résistance et la libération progressive de protéides dans les milieux de culture. Ainsi, après quelques mois à 37° C, la paratuberculine de certaines souches serait aussi active que la paratuberculine vraie, et jouirait d'activité spécifique pour les animaux sensibilisés par leurs souches.

Pour Wijnmüller l'addition de Tween 80 comme diluant de la tuberculine augmenterait la réaction proprement tuberculi-

nique, mais diminuerait les dimensions de certaines réactions non spécifiques ; cela permet donc une meilleure séparation entre les sujets infectés par le bacille de Koch et les autres paratuberculeux.

Récemment, Magnusson M. prépara des paratuberculines purifiées appelées sensitines, à partir de 16 souches de bacilles acido-résistants, dont la spécificité s'est montrée très satisfaisante : Des cultures sur milieu de Sauton moyen sont, après incubation à 38° C, stérilisées par un courant de vapeur durant une heure ; le filtrat de culture sur bougie de Berkefeld est concentré par ultra-filtration à travers des filtres de collodion, puis précipité par l'acide trichloracétique jusqu'à la concentration finale de 2 % ; le précipité est centrifugé et lavé à l'acide trichloracétique à 2 % ; la déshydratation de la sensitine est obtenue en remuant le précipité avec de l'éther anhydre ; quelques variantes dans la technique sont nécessaires auprès de certaines souches. Puis des sensitines ont été préparées par Magnusson, Engbaeck et Bentzon, à partir de 10 souches photochromogènes de 2 souches Battey et de 24 souches non classées ; la spécificité de la réaction fut étudiée par des tests intradermiques comparatifs sur les cobayes sensibilisés par ces souches. Il en résulte :

1° que l'on ne peut différencier les souches tuberculeuses humaines et bovines ;

2° mais les souches tuberculeuses aviaires sont différentes de celles des mammifères ;

3° il n'y a pas de différence entre les 3 souches aviaires ;

4° les sensitines des mycobactéries Balnei et de 4 autres mycob. atypiques, dont une de *M. Smegmatis*, ont montré des spécificités différentes, à la fois entre elles, et avec celles des sensitines humaines, bovines et aviaires. Enfin, dans l'ensemble, il y a une bonne corrélation entre le classement des bacilles suivant la spécificité de leur sensitine et le classement suivant leurs autres caractères ; ainsi la méthode s'avère très utile pour le diagnostic des bacilles acido-résistants.

2. Notre expérimentation

Notre expérimentation porte sur huit lots de cobayes, que nous avons inoculés avec différentes mycobactéries atypiques et dont nous avons testé l'allergie avec des tuberculines variées.

a) *Techniques :*

Nous avons inoculé les cobayes avec deux souches Kansasii et cinq souches Aquæ en injections sous-cutanées ou intra-dermiques de 1 ml, d'une suspension de Mycobactéries à 1 mg/ml.

Trente jours après, nous testons les lots avec 1/10 de tuberculine brute de l'Institut Pasteur en intra-dermique, puis, avec les paratuberculines que nous obtenons de la façon suivante : une culture en milieux de Dubos de la mycob. atypique âgée de 1 mois à 50 jours, est retirée de l'étuve, filtrée de ses bacilles et concentrée 2 fois, mais ne subit ni précipitation ni purification.

Les lots de cobayes reçoivent aussi le BCG-test et ses homologues constitués par des souches atypiques : leur préparation est différente : 75 mg de BCG sont dilués dans 1 ml, puis dilués 4 fois puis chauffés au bain-marie à 100° C durant 10 minutes : ainsi 1 ml = 18,5 mg de BCG tué ; on en injecte au cobaye 1 goutte, soit 1/10^e de cm³ en intra-dermique.

Pour les mycob. atypiques, une suspension de 1 mg par ml est tuée par ébullition durant 10 minutes, et concentrée à 1,5 mg/cm³ ; on injecte alors en intra-dermique une quantité double de 2/10^e de ml.

Nous avons aussi fait un test au bacille virulent préparé dans les mêmes conditions.

La lecture de l'allergie se fait 48 heures après et ultérieurement pour les tests négatifs, pour ne pas omettre une réaction tardive éventuelle ; on élimine la possibilité d'une allergie protéinique non spécifique : en effet les réactions positives ont toujours été des réactions tardives de type allergique, et toutes ont concordé.

b) *Résultats :*

Nous verrons dans les tableaux des expériences qui sui-

vent, que la lecture des réactions est notée selon leur intensité ; nous avons aussi noté si l'inoculation avait provoqué un abcès local ou non ; le signe == signifiera la mort de l'animal.

1° Le 29-12-61 : Inoculation d'un lot de 10 cobayes en intradermique, avec la souche Sim., mycob. Kansasii, isolée de l'expectoration d'un malade atteint d'une pneumopathie chronique pseudotuberculeuse dont elle est la cause :

Durée après l'inoculation	Tests effectués	1	2	3	4	5	6	7	8	9
40 ^e jour	: Tuberculine à 30 %	0	0	0	+	0	+	+	0	0
45 ^e jour	: Tuberculine brute I.P.	+	+	0	+	+	+	+	+	0
47 ^e jour	: BCG-test	+	+	±	+	+	+	+	+	0
54 ^e jour	: Bou-test	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61 ^e jour	: EV40-test	0	+	0	+	0	+	+	0	+
61 ^e jour	: Bacille virulent- test	+	+	0	+	+	+	0	0	+
73 ^e jour	: Mér.-test	+		0	0	0	0			0
6 ^e mois	: Tuberculine brute I.P.	±	±	±	±	±	±	±	±	±
7 ^e mois	: Tuberculine Fer	0	0	0	0	0	±	0	0	0
11 ^e mois	: Idem	0	0	0	0	0				
11 mois et 2 jours :	BCG-test tué	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11 mois et 2 jours :	Tuberculine brute I.P.	+	+	==	==	+	+	+	==	+
11 mois et 6 jours :	Tuberculine EV40	==	±			0	==	0		==
11 mois et 6 jours :	Tuberculine Çot. .		±			0		0		

Pour la commodité de la lecture, signalons à nouveau la classification de ces souches :

— Kansasii (Fer., Sim., Aba.) ;

— Aquæ I (Bou., Pay.,) et II (EV40, Cot., Sek.).

2° Le 6-12-61 : Inoculation de 10 cobayes en intra-dermique, avec la souche Fer., mycob. Kansasii, provenant des crachats d'un malade atteint d'une pneumopathie pseudo-tuberculeuse dont elle est la cause :

Réaction au point d'inoculation :

Durée après l'inoculation	Tests effectués	abcès	"	"	"	"	"	0	0	0
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
6 ^e jour	: Tuberculine brute									
	I.P.	+	+	+	+	+	+	0	0	0
8 ^e jour	: BCG-test							0	0	0
12 ^e jour	: BCG-test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14 ^e jour	: Bou-test	±	±	±	±	0	±	±	±	±
17 ^e jour	: Cot-test	+	+	+	+	0	+	+	+	+
21 ^e jour	: EV40-test	+	+	±	+	0	0	±	±	±
31 ^e jour	: Bacille virulent-test	+	+	+	+	0	0	+	+	+
36 ^e jour	: Mer-test	0	±	±	±	±	±	0	±	+
6 mois	Tuberculine brute									
	I.P.	==	==	+	+	+	==	==	==	==
6 mois et 2 jours	: Tuberculine Fer .			++	++	++				
9 mois	Idem			++	++	++				
9 mois	BCG-test tué			++	++	++				
9 mois et 2 jours	: Tuberculine brute									
	I.P.			++	++	++				
				++	++					
9 mois et 2 jours	: Tuberculine EV40			++	++	+				
9 mois et 6 jours	: Tuberculine Cot .			++	++	+				

3° Le 30-1-62 : inoculation d'un lot de 7 cobayes en ID avec la souche Bou. (mycob. Aquæ, groupe II) isolée sur un enfant qui présentait une ulcération cutanée pseudotuberculeuse :

Durée après l'inoculation	Tests effectués	1	2	3	4	5	6	7
37 ^e jour	: Tuberculine brute							
	I.P.	±	±	±	±	0	±	0
37 ^e jour	: BCG-test tué	±	±	±	+	±	±	0
6 mois	: Tuberculine Fer .	0	0	0	0	0	0	0
6 mois	: Tuberculine brute							
	I.P.	0	0	0	0	0	0	0
6 mois	:							
et 2 jours	: Tuberculine Bou.	0	0	0	0	0	0	0
9 mois	: Idem	0 ==	++	0 ==	==	==	==	==
9 mois	: BCG-test	0		0	0			
9 mois	: Tuberculine brute							
	I.P.	++	+++	++				
9 mois								
et 6 jour	: Tuberculine EV40	++	++	0				
9 mois								
et 6 jour	: Tuberculine Cot .	++	++	0				

4° Le 24-1-62, inoculation d'un lot de 7 cobayes en ID avec la souche Sek. (mycobacterium Aquæ groupe II), isolée d'une expectoration sans valeur pathologique :

Durée après l'inoculation	Tests effectués	1	2	3	4	5	6	7
26 ^e jour	: Tuberculine brute							
	I.P.	+	0	0	0	0	±	0
26 ^e jour	: EV40-tué	0	0	0	0	0	0	0
26 ^e jour	: Aba.-tué	+	0	0	±	0	±	0
28 ^e jour	: BCG-test	+	0	0	±	+	0	0
42 ^e jour	: Sek-test	0	0	==	±	0	0	==
5 mois	: Tuberculine Fer .	0	0		0	0	0	
	Tuberculine brute							
5 mois	: I.P.	0	0		0	0		
8 mois	: Tuberculine Fer .	+	0	==		±	+	
8 mois	: BCG-test	+	+			±	+	
8 mois								
et 2 jours	: Tuberculine brute							
	I.P.	++	++			++	+++	

5° Le 23-2-62, inoculation d'un lot de 10 cobayes en ID avec la souche EV40 (mycob. Aquæ, groupe II), isolée d'un bovidé :

Durée après l'inoculation	Tests effectués	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5 ^e jour	: Tuberculine brute										
	au 1/2	0	==	0	0	0	0	0	0	0	0
5 ^e jour	: BCG-test	±		+	==	==	==	==	==	==	==
mois	: Tuberculine Fer .	+		+							
mois											
et 2 jours	: BCG-test	+		+							
mois											
et 2 jours	: Tuberculine brute										
	I.P.	++		+++							
mois											
et 6 jours	: Tuberculine EV40	++		+							
mois											
et 6 jours	: Tuberculine Cot .	0		0							

6° Le 9-3-62, inoculation d'un lot de 7 cobayes avec la souche Leg. (mycob. Aquæ groupe II), isolée d'une expectoration sans valeur pathogène ; les 3 premiers cobayes en sous-cut. de 0,50 cm³ et les 4 suivants en intra-dermiques de 0,25 cm³ :

Durée après l'inoculation	Tests effectués	1	2	3	4	5	6	7
7 mois								
et 8 jours :	Tuberculine Fer .	0	0	0	0	0	0	0
7 mois								
et 8 jours :	BCG-test tué ==		0	0	±	==	==	0
7 mois								
et 10 jours :	Tuberculine brute							
	I.P.		+	+	+			+
7 mois								
et 16 jours :	Tuberculine EV40		++	+	++			0
7 mois								
et 16 jours :	Tuberculine Cot .		0	0	0			0

7° Le 10-4-62, inoculation de 5 cobayes avec la souche Pay. (mycob. Aquæ groupe I), responsable d'une suppuration ganglionnaire chez un enfant ; le premier cobaye en Intra-derm. et 4 en sous-cut. :

Durée après l'inoculation	Tests effectués	1	2	3	4	5
25 ^e jour	: Tuberculine I.P.	+	0	0	0	0
5 mois	: au 1/2	+	0	0	0	0
5 mois	: Tuberculine Fer .	+	+	±	0	0
5 mois	: BCG-test	+++	+	+++	+++	++
5 mois						
et 6 jours :	Tuberculine brute				-	
	I.P.	=	0	0	±	0
5 mois						
et 6 jours :	Tuberculine EV40					
	Tuberculine Cot .	0	0	0	0	0

Conclusions :

On notera chez tous ces cobayes une allergie non spécifique, car les réactions avec la tuberculine brute et le BCG-test furent souvent plus violentes que l'allergie paratuberculinique.

D'autre part, l'allergie mise en évidence par les paratuberculines ou les bacilles-tests atypiques, révèle des réactions beaucoup plus faibles qu'avec la tuberculine brute.

Mais si l'on utilise la mycob. atypique préparant les animaux ou sa paratuberculine, on obtient toujours une réaction intense, autant que celle à la tuberculine, bien que le titrage de la paratuberculine soit très faible.

CHAPITRE III

LES REACTIONS SEROLOGIQUES

Les nombreuses recherches effectuées dans le domaine du diagnostic sérologique de la tuberculose, furent appliquées à la différenciation des autres espèces mycobactériennes. Nous allons passer en revue l'application des réactions suivantes au diagnostic des mycobactéries atypiques : réactions de séro-agglutination, de fixation, d'hémagglutination et d'hémolyse, d'immuno-électrophorèse et nous terminerons par notre expérimentation de séro-agglutination.

1. Réactions de séro-agglutination

La séro-agglutination des mycobactéries ne put être étudiée que le jour où l'on a pu rendre une culture en suspension homogène : en 1947, Arloing et Courmont utilisèrent la souche SAPC, dont nous avons parlé plus haut ; elle se comporta comme une souche de bacille paratuberculeux, ayant une constitution antigénique très voisine de celle du bacille de Koch ; elle réagit avec les agglutinines du sérum de tuberculeux, au point que Sohler l'utilisa comme témoin de la vaccination BCG.

La même année, Rotach rechercha une spécificité de type, par l'agglutination en suspension alcoolique de bacilles aviaires chauffés à 80° C pendant une heure ; mais la spécificité était faible avec les antisérum obtenus en injectant en intra-veineux au lapin des germes tués ; par contre il obtint une spécificité stricte en traitant les germes selon la méthode de l'absorption

des anti-corps de groupe, par des bacilles d'une souche hétérologue (bovine ou humaine), selon la technique décrite par Schaeffer.

Les résultats fournis par les deux méthodes sont comparables : l'auteur distingue ainsi quatre types sérologiques parmi les bacilles tuberculeux du groupe aviaire ; le type III existe aussi pour le bacille saprophyte du cobaye ; le type IV rare, se rapproche des bacilles avirulents des autres types ; ainsi des bacilles différents possèdent les mêmes antigènes.

En 1959 Viallier, Despierres et Mlle Cayré constatent que le sérum de tuberculeux agglutine d'autres mycobactéries ; et inversement une mycob. atypique était agglutinée par le sérum d'animaux et de tuberculeux porteurs d'autres mycobactéries. Ici la méthode de saturation des agglutinines a montré que les mycob. mises en évidence en présence d'un certain nombre de sérum, ne suffisait pas toujours à faire disparaître totalement le pouvoir agglutinant des sérums.

Cependant en 1961, Beck A. parvient à sensibiliser le tégument de cobaye avec des bacilles acido-résistants atypiques, et obtient très fréquemment l'agglutination des germes mis en présence de sujets ou d'animaux hébergeant la mycobactérie.

En somme actuellement, les réactions de séro-agglutination ne permettent pas de mettre suffisamment en évidence les antigènes mycobactériens de type, comme notre expérimentation le confirmera.

2. Les réactions de fixation du complément

En 1928, Mme Alexa rechercha les caractères antigéniques des extraits méthyliques du bacille de la Fléole et de divers bacilles paratuberculeux. Ces extraits déviaient le complément avec les sérums homologues, et provoquaient l'apparition d'une sensibilisation dans le sérum des animaux auxquels on les inocule ils fixent l'alexine à des titres divers, en présence de sérums homologues et des sérums anti-tuberculeux mais leur pouvoir antigénique est inférieur à celui des bacilles tuberculeux. *In-vivo* le bacille de la fléole forme des anticorps, dont les réactions de fixation s'entrecroisent avec les antigènes méthyliques des bacilles paratuberculeux ; donc la réaction est dépour-

vue de spécificité. Cette propriété antigénique commune aux Mycobactéries serait due ici au groupe des phosphatides solubles dans l'alcool méthylique et insolubles dans l'acétone.

Les réactions antigéniques existant entre les différentes souches de mycobactéries chromogènes, phlei, BCG et tuberculeuses furent étudiées par la réaction de fixation du complément suivant la méthode de Kolhmer par Mankiewicz en 1958 ; il montra les chevauchements entre les antigènes des bacilles tuberculeux, typiques ou atypiques, et ceux des saprophytes.

Puis Patterson D.S. et A.B. utilisèrent des extraits acqueux de mycobactéries, préalablement traités à l'acétone ; ils trouvèrent alors que le pouvoir de fixation du complément varie selon les souches et les extraits successivement obtenus à partir d'une souche donnée. Et il n'y a pas de spécificité sérologique à l'égard d'antisérums bovins. Du point de vue chimique, il n'y aurait pas de corrélation entre l'activité sérologique, et les pourcentages d'azote totale ou protéique, de phosphore ou de glucides de l'antigène mais il y a corrélation entre le taux de lipoïdes résiduels et l'activité sérologique, en relation quantitative avec le phosphore phosphatidique. En somme, les variations de composition ou d'activité des extraits acqueux ne permettent pas leur emploi pour des études précises, mais il semble que des préparations de phosphatides pourraient donner des antigènes à propriétés constantes.

Récemment, Beck A. pratiqua des épreuves d'absorption et d'inhibition sur des sérums d'animaux sensibilisés à des mycobactéries atypiques ; dans les mycobactéries photochromogènes il trouva un antigène spécifique qui permet de les distinguer du bacille tuberculeux humain et des mycob. phlei et smegmatis ; en dehors de cet antigène il semble encore y en avoir deux autres : l'un porté par le bacille tuberculeux seul, l'autre commun aux 4 souches étudiées.

3. Les réactions d'Hémagglutination et d'Hémolyse

Middlebrook et Dubos utilisèrent une agglutination d'hématis sensibilisées par des tuberculines ; une fraction des polysaccharides de ces dernières sont indispensables, comme le précisa récemment Folder J. ; les résultats de l'agglutination et de l'hémolyse ne concordent pas toujours, et ne se montrent pas

très spécifiques ; ainsi l'hémagglutination au taux de 1/8 est positive chez 4 % des sujets sains, 97 % des tuberculeux et 97 % des lépromateux ; enfin le BCG positive 50 % des vaccinés.

Thurston et Rheims, en 1956, accroissent la sensibilité des antigènes sensibilisant les hématies en préparant des extraits de mycob. non dégraissés avec de l'eau ou du sérum physiologique à 37°C : il semble que ces antigènes n'ont pas la même composition dans les bacilles BCG et dans les bacilles de la fléole, et que leur sensibilité est également différente. L'auteur pense étudier les différents systèmes antigène-anticorps, par la technique des extractions répétées d'une même masse bacillaire.

Cependant Lagercrantz R. confirme la capacité de divers microbes de produire des anticorps pour des antigènes érythro-adsorbables du bacille tuberculeux ; et que pour une même souche les anticorps varient beaucoup avec les animaux ; et les bacilles paratuberculeux engendrent des taux d'anticorps souvent du même ordre de grandeur ou même plus élevés que ceux déterminés par mycob. tuberculosis ou H37Rv (1/256). Les staphylocoques produisent chez tous les animaux des réactions sérologiques atteignant 1/32^e ; les champignons et les diverses souches microbiennes donnent des résultats positifs au 1/16^e quelquefois. Agissent-ils comme adjuvant, ou possèdent-ils une parenté antigénique avec les mycobactéries ? Il n'existe aucun rapport entre les taux de ces anticorps et celui de l'anti-staphylo-lysine.

Ces réactions amènent à faire quelques réserves sur la spécificité de la réaction de Middlebrook Dubos.

Puis Lagercrantz étudia des fractions érythro-adsorbables de diverses souches mycobactériennes et du staphylocoque doré : il utilise les germes entiers, les extraits, les filtrats, les tuberculines diversement préparées ; ces produits sont mis en présence d'animaux immunisés par les mêmes souches ou des sérums humains sains, tuberculeux ou autrement malades ; les réactifs homomogues et hétérologues ont été testés selon la réaction d'hémagglutination ; les mêmes procédés ont été employés après absorption préalable des anticorps par des germes entiers, leur inhibition est recherchée par l'addition de

tuberculines ou de filtrats ou d'extraits. Les résultats permettent d'affirmer les parentés antigéniques de divers souches de mycobactéries, et même à un moindre degré du staphylocoque ; les réactions les plus recommandables sont celles d'absorption par les germes entiers et par les hématies sensibilisées, et la réaction d'inhibition : elles peuvent être d'une grande utilité pour la détermination pratique des mycobactéries.

Merkal et Larsen en 1958, ont étudié plus particulièrement les relations antigéniques du bacille de Johnne avec la tuberculine : les hématies de 113 bovidés sains, et infectés ou préparés avec les deux mycob. ont été étudiées par la fixation de la tuberculine PPD et de la johnine PPD dans la réaction passive ; mais les globules rouges de 50 % environ de ces animaux ne purent être sensibilisés par ces haptènes.

Nassau et Schwabacher font réagir des sérums de malades tuberculeux aux antigènes préparés avec des mycobactéries atypiques « jaunes », et inversement des sérums de malades porteurs de paratuberculeux avec de la tuberculine. Les sérums de cobayes infectés par des souches humaines ne réagirent qu'avec l'antigène tuberculinique ; des sérums d'animaux infectés avec des souches atypiques de bacilles jaunes, réagirent aussi à l'antigène tuberculinique ; l'absorption de ces sérums avec la souche H37Rv et les bacilles atypiques tués à la chaleur donna un modèle d'absorption typique, c'est-à-dire que le H37Rv déplaçait les anticorps, laissant les échantillons jaunes inchangés. Les bacilles jaunes déplaçaient tous les anticorps humains et jaunes. L'auteur suggère que du sérum hyperimmun de lapin, de spécificité bien marquée pour l'antigène jaune, pourrait être préparé et utilisé pour l'identification de souches atypiques du type du bacille jaune.

En 1959, Schwabacher a repris les tests d'hémolyse avec du serum de lapin hypérimmunisé au mycob. *Xenopei* : le titrage est identique à ceux qui sont immunisés avec le bacille de Koch, ou bien si les hématies sont sensibilisées avec la vieille tuberculine de Koch ; mais si elles le sont avec une paratuberculine, de hauts titres sont obtenus avec les sérums anti-xenopei et le plus souvent avec les sérums anti-aviaires, tandis que les titres avec les anti-humains et les anti-bovins sont bas. Les sérums de 18 malades porteurs de mycobactéries atypiques ne donnèrent aucuns hauts titrages.

Enfin, par l'absorption croisée avec les antigènes hétérologues, des antisérums hautement spécifiques furent obtenus.

Beck A. en 1961 testa les antisérums de 4 souches de paratuberculeux avec leur paratuberculine PPD respectives, par la réaction d'hémolyse ; mais les différences entre les positivités des réactions avec les paratuberculines homologues et hétérologues ne sont pas assez nettes pour faire la distinction entre ces souches. Notons que sur le plan chimique, Takahashi et Fujita et Sasaki font le point de la spécificité des méthodes d'héماغglutination passive utilisées chez les tuberculeux.

En somme, les réactions d'Héماغglutination et d'Hémolyse de Middlebrook et Dubos actuellement n'offrent pas de garanties suffisantes pour être employées dans le diagnostic des mycobactéries.

4. Méthodes Immuno-électrophorétiques

Une étude comparative de la technique précédente avec la technique de la précipitation sur gélose démontra du point de vue de la spécificité, une nette supériorité de cette dernière (Luridiano et Ganzetti).

Utilisant des filtrats de culture comme antigènes, Parlett et Youmans en 1956 déterminaient 4 groupes antigéniques entre 42 souches mycobactériennes :

Le groupe I, le plus vaste, contenait 4 antigènes précipitant les anticorps sériques homologues : ils étaient produits par chacune des espèces de ce groupe I, qui comprend les souches humaines connues virulentes et avirulentes, à l'exception d'un groupe de mycob. atypiques, isolées de malades humains, d'une souche bovine atténuée et d'une souche aviaire.

Le groupe II se composait essentiellement de souches d'origine bovine et d'une souche aviaire ; les membres de ce groupe produisaient seulement deux antigènes, qui étaient identiques à 2 des antigènes des filtrats du groupe I.

Le groupe III comprenait essentiellement des souches saprophytes ; ces organismes produisaient 3 antigènes identiques de souche à souche à l'intérieur de ce groupe, mais entièrement différents des antigènes des groupes I, II et IV.

Le groupe IV se constituait d'une seule souche atypique qui produisait deux antigènes sans relation avec les 3 groupes précédents.

Deux ans plus tard, Mankiewicz classait les mycob. d'origine humaine en 4 groupes : I. à parentés antigéniques de mycob. virulentes ; II. apparenté aux saprophytes (phlei) ; III. apparenté aux bacilles virulents et saprophytes ; IV. apparenté à d'autres chromogènes.

Puis Parlett et Youmans cherchèrent à détecter dans le sérum de tuberculeux, des anticorps par la technique de précipitation par double diffusion sur gélose en tube Pyrex ; les antigènes utilisés étaient des préparations de filtrat concentré de cultures de mycobactéries tuberculeuses humaines, de souches H37Rv, de mycob. ulcerans, de *Nocardia*, de *Penicilium notatum* et de *Candida albicans*. Tous les sérums sauf 4, possédaient des anticorps ne réagissant qu'avec les antigènes présents dans les filtrats de H37Rv et du bacille de Koch ; les 1 sérums négatifs n'étaient pas tuberculeux, et celui qui venait d'un malade affecté par une mycob. ulcerans, ne réagit que vis-à-vis du filtrat de cette souche. Parmi les sérums de 38 bien-portants à cuti positives, 2 seulement réagirent aux antigènes paratuberculeux (2 suspects de tuberculose).

Cette méthode de double diffusion sur gélose d'Outcherlony a subi récemment diverses améliorations et variantes par Parlett, Luridiana et Manigault. Parlett considère que si la présence d'anticorps non spécifiques ou des erreurs de diagnostic peuvent être à la base des « réactions faussement positives ou négatives », celle-ci s'expliquent souvent : dans le premier cas, par des précipités inorganiques dûs à un pH mal ajusté, dans le second par l'absence d'un rapport optima entre les concentrations d'anticorps et d'antigènes ; des améliorations à la technique du test sont conseillées, ainsi qu'à la méthode de lecture des réactions.

Lind A. utilisa d'une part, un filtrat concentré ou non de culture sur Sauton, incubé pendant des temps variables, et d'autre part une suspension de corps bacillaires obtenue par traitement avec l'urée ou l'hexane-phénol ; certaines préparations sont fractionnées selon la méthode de Seibert et ensuite analysées ; parallèlement diverses tuberculines usuelles furent

analysées. Par cette méthode, Lind étudia les réactions entre les précipitinogènes de mycob. tuberculosis, *M. smegmatis*, et *M. tuberc. var. avium* : il y a 15 systèmes de précipitation pour *M. tuberculosis*, 7 pour *M. phlei* et *M. smegmatis* et 5 pour *M. avium*.

Sa méthode permet aussi de différencier les souches étudiées l'une de l'autre et aussi d'autres souches de mycobactéries ; mais aucune différence n'a été mise en évidence entre les bacilles tuberculeux humains et bovins, y compris le BCG. Lind montre l'importance de l'établissement de « systèmes de référence » standardisés par la classification des mycobactéries.

En effet Castelnuevo, Gaudio et Morellini ont isolé certains antigènes propres à chaque espèce, ou antigènes d'espèce, d'autres communs à plusieurs espèces, ou antigènes de groupe, et un autre commun à toutes les espèces, ou antigène de genre ; ils utilisaient pour l'analyse, les extraits complexes, obtenus par broyage de nombreuses mycobactéries congelées à -60°C .

Pour Hirano, Sushika, les mycobactéries d'origines humaines semblent présenter des caractères communs ; et certains malades tuberculeux présentent des anticorps contre les mycob. atypiques. Les mycob. du lait ne réagissent pas avec les sérums anti-souches humaines, mais par contre avec les sérums anti-souches bovines.

Penso souligne l'immuabilité antigénique d'une espèce bien déterminée, et aucun rapport entre la résistance aux antibiotiques et la composition antigénique.

Le tableau de la classification selon la mobilité antigénique par électro-phorèse, d'après Penso (Devulder, thèse) montre que le bacille tuberculeux bovin semble posséder le plus d'antigènes, suivi par *M. tuberculosis*, le BCG, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. marianum*, *M. marinum*, *M. smegmatis*, *M. lacticola* et *M. phlei*. Peut-être doit-on conclure avec Castelnuevo, que pour une virulence décroissante, on détecte un nombre décroissant d'antigènes.

Il semble donc possible, par cette méthode, de faire rentrer une mycobactérie dans un groupe établi strictement, ce qui amorce une autre classification.

5. Notre expérimentation de séro-agglutination

Nous avons isolé à partir d'expectoration et de liquide pleural, d'un malade mort d'une affection pulmonaire non tuberculeuse, une mycobactérie atypique de l'espèce *Kansasii*, souche *Aba.*, à pigmentation jaune non pathogène pour les animaux ; elle fut cultivée en milieu de Dubos au Tween 80, et étudiée par agglutination avec les sérums de différents animaux et des sérums humains. Dans les mêmes conditions, nous avons recherché l'agglutination de la souche homogène *SAPC*, et celle de deux autres souches *Ese.* et *Mar.*, mycobactéries *Aquæ I* et *II* non pathogènes, isolées à partir de l'expectoration de tuberculeux pulmonaires.

Les souches *SAPC* et *Aba.* sont en suspension d'eau peptonée glycéinée, et les autres souches *Ese.* et *Mar.* en suspension dans du sérum physiologique, à partir d'une culture sur Lowenstein.

Les dilutions des sérums utilisés ont été de : $1/5^e$, $1/10^e$, $1/20^e$, $1/30^e$, $1/50^e$, $1/80^e$; et nous avons tenu compte des agglutinats microscopiquement visibles de type II, après un séjour de 4 à 12 heures à l'étuve à 37° C.

A) Sérums animaux :

Différents animaux avaient reçu 12 à 15 fois une injection intrapéritonéale ou sous-cutanée d'une mycobactérie, à la dose de $0,5 \text{ cm}^3$ de solution Formolée, diluée au $1/10^e$ de mg par cm^3 . Les animaux sont sacrifiés un nombre variable de semaines après :

1° Sérums d'animaux injectés avec la souche *Aba.* :

<i>Antigènes</i> : souches	<i>Aba.</i>	<i>SAPC</i>
1 poule inoculée en I.V. 5 mois avant	+1/80	+1/20
2 cobayes inoculés 45 jours avant ..	1/80	0
2 souris inoculées 45 jours avant ..	0	0
6 rats inoculés 45 jours avant	0	0

2° Sérums d'animaux tuberculisés :

14 cobayes inoculés 45 jours avant ..	0	1/5
2 cobayes inoculés 45 jours avant ..	1/5	1/5
1 cobaye inoculé 45 jours avant ...	1/10	1/30

3° Sérums d'animaux inoculés avec les souches *Esé.* et *Mar.* (mycobactérie *Aquæ II* et *I*) :

<i>Antigènes : souches</i>	Aba.	SAPC
4 cobayes inoculés 60 jours avant ...	1/5	1/10
2 poules inoculées 7 mois avant	1/80	1/60
4° Sérums d'animaux injectés avec du BCG :		
4 rats inoculés 21 jours avant	0	0

B) *Sérums humains :*

1° Treize sérums provenaient de tuberculeux pulmonaires évolutifs ou en voie de guérison ; ils ont été soumis à l'épreuve d'agglutination des 4 souches de mycobactéries atypiques SAPC, Aba., Esé., Mar. ;

	SAPC	Aba.	Esé	Mar.
6 sérums de tuberculeux				
	1/50	1/80		
	1/20	1/30		
	1/30	1/30		
	0	0	0	
	1/5	1/80	0	0
Puis 7 sérums de tuberculeux après saturation des agglutinines avec Esé. et Mar. ce qui n'empêche pas le taux de 1/80 de subsister avec la souche Aba.	0	1/5	0	0
	1/80	0	0	0
	1/50	1/80	0	0
	1/30	1/20	0	0
	0	1/30	0	0
	1/80	1/80	0	0
	1/80	1/80	0	0

En somme, 8 sérums agglutinaient la souche Aba. au 1/80^e, 4 à un moindre taux 1/50^e et 1/30^e ; pour 11 de ces 13 malades les taux d'agglutination pour les mycobactéries atypiques et SAPC étaient voisins, et légèrement inférieurs pour la dernière. Un 13^e sérum n'agglutinait aucune souche ; et l'agglutination des deux souches *Aquæ* est restée négative partout.

2° Nous avons repris la séro-agglutination en élargissant les données : 11 sérums de tuberculeux et 2 sérums de malades porteurs de Mycobactéries atypiques (ils avaient été traités par antibiotiques auparavant), avec 7 souches mycobactériennes : 2 homogènes (SAPC, Cha.), 1 *Kansasii* (Aba.), 3 *Aquæ* II et I (Esé., Mar., Bou.) : 8 sérums de tuberculeux pulmonaires avec :

SAPC	Cha.	Aba.	Bou.	Esé.	Mar.
1/80	1/30	1/20	0	0	0
0	0	0	0	0	0
1/20	0	1/30	0	0	0
1/80	0	1/80	0	1/20	0
0	0	1/20	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1/10	0

Puis sérum du malade Bou. :

0	0	0	0	0	0
---	---	---	---	---	---

Trois sérums de tuberculeux pulmonaires avec en plus la souche Fer. (mycob. Kansasii) :

SAPC	Cha.	Aba.	Fer.
1/10	1/30	1/30	0
1/10	1/30	1/30	0
1/10	1/30	1/30	0

Sérum du malade Fer. :

1/5	1/20	+1/80	0
-----	------	-------	---

En somme 2 sérums sur 13 agglutinent la souche Aba. (Kansasii) dont le malade Fer. ; 5 sérums l'agglutinent à un taux moindre ; les sérums des malades Bou. et Fer n'agglutinent pas leurs propres souches ; pour 6 sérums les taux d'agglutination des mycobactéries SAPC, Cha. et Aba. étaient voisins ; enfin 3 sérums n'agglutinaient rien.

3° Quatre sérums de sujets à cuti-réactions apparemment négatives n'ont donné aucune agglutination avec la souche SAPC, mais deux fois une agglutination au 1/80^e avec la souche Aba. (Kansasii).

4° Nous avons testé le pouvoir agglutinant pour les quatre souches atypiques, de 7 sérums de tuberculeux pulmonaires évolutifs dans un premier temps :

	1	2	3	4	5	6	7
SPAC	1/50	1/80	1/20	1/30	0	1/30	1/20
Aba.	1/80	1/80	1/50	0	0	1/80	1/30
Esé.	0	0	0	0	0	0	0
Mar.	0	0	0	0	0	0	0

On voit que pour 2 sérums (4, 5) les résultats sont négatifs ; les 7 sérums n'ont pas d'action sur les saprophytes

du groupe Aquæ. Dans un 2^e temps, les 5 sérums (1, 2, 3, 6, 7) ont été saturés selon le procédé classique en les plaçant 3 heures à l'étuve à 37° C, additionnés successivement d'un mélange des 3 souches de bacilles tuberculeux humains virulentes cultivées sur milieu solide, ce qui est resté sans résultat.

La saturation des mêmes sérums par le mélange de deux mycob. saprophytes Esé. et Mar. (du groupe Aquæ), ont amené une baisse du taux des agglutinines avec la souche Aba. (Kansasii) : (1) 1/30, (2) 1/80, (3) 1/80, (6) 1/50, (7) 1/10 ;

Enfin la saturation par l'antigène mycobactérien lui-même de la souche Aba., a fait perdre à 3 sérums sur 5 leur propriété agglutinante : (1) 0, (2) 1/80, (3) 1/50, (6) 0, (7) 0 ;

5^o Puis nous avons testé les propriétés agglutinantes du sérum du malade Fer., porteur d'une mycob. atypique du groupe Kansasii, vis-à-vis de différentes souches atypiques avec lecture dans les 16 heures :

Groupe Homogène : SAPC 1/5, 1/5 ; Cha. 1/30, 1/20 ;

Groupe Kansasii : Aba. 1/80, 1/80 ; Fer. 1/80, 1/80 ; V.S. 0 ;

Groupe Avium : Mil 0 ; Far. 1/80, 0 ; Her. 0 ;

Groupe Aquæ I : Bou. 0 ;

Groupe Aquæ II : 935, 294, 0 ; Ley 0 ; Sal. 0 ;

6^o Nous avons aussi tenté des Séro-agglutinations avec des sérums de 8 lapins et de 8 cobayes, que nous avons inoculés avec des mycobactéries atypiques tuées : nous injectons 1/2 cm³ d'une solution formolée diluée au 1/10^e de mg par cm³ de bacilles en sous cutané, tous les deux jours et 14 fois ; les animaux étaient sacrifiés un mois après ; leurs sérums testèrent l'agglutination de 5 souches, dont 2 en suspension d'eau peptonnée glycinée, et les autres en suspension dans du sérum physiologique à partir d'une culture sur Lowenstein : Toutes les réactions furent négatives.

C) *Liquide d'ascite sarcomateuse de souris :*

Nous avons pensé utiliser les anticorps contenus dans le liquide d'ascite : chaque lot de souris, composé environ d'un

nombre égal de témoins marqués et d'inoculés, se trouvent dans le même bocal, pour qu'elles aient toutes au départ les mêmes anticorps. La moitié de chaque lot de 14 souris est inoculée en intradermique d' $1/10^e$ de cm^3 d'une de nos souches de mycobactéries atypiques ; l'autre moitié témoin reçoit $1/10^e$ de cm^3 de sérum physiologique pour subir la même agression de la seringue. Un mois plus tard, pour obtenir un volume suffisant de liquide d'ascite, nous avons inoculé en injection intra-péritonéale $1/10^e$ de cm^3 de liquide d'ascite sarcomateuse d'Erich dilué à chaque lot de souris, les témoins étant inclus. On sait en effet que cette production d'ascite est utilisée pour obtenir une quantité plus importante d'anticorps : c'est là un procédé classique utilisé chez la souris, animal de petite taille ne pouvant fournir qu'une quantité limitée de sérum sanguin.

Cette injection amène la production d'une ascite cancéreuse qui amène la mort de l'animal ; il est alors nécessaire que le cadavre soit mis au frigidaire le plus tôt possible. Le liquide d'ascite est maintenu deux heures à 37^o , puis centrifugé ; on recherche les agglutinines dans la partie claire surnageante comme s'il s'agissait d'un sérum sanguin.

Puis ce liquide est dilué à l'eau distillée de $1/10^e$ jusqu'au $1/610^e$. On recherche les agglutinines en ajoutant les deux souches de mycob. atypiques SAPC et Aba., diluées à l'eau distillée de 0,2 à 0,4 cm^3 par tubes pour avoir la même opalescence dans tous les tubes. Les galeries sont portées à l'étuve à 37^o et la lecture se fait à la 12^e et 24^e heure.

Résultats :

1^{er} lot de 13 souris, dont 8 inoculées avec la souche Bou. (groupe Aquæ) : agglutinations négatives ;

2^e lot de 12 souris, dont 5 inoculées avec la souche Tyr. (Aquæ) : agglutinations négatives ;

3^e lot de 12 souris, dont 7 inoculées avec la souche Cot. (Aquæ) : agglutinations négatives ;

4^e lot de 14 souris, dont 7 inoculées avec la souche Ley. (Aquæ) : agglutinations négatives ;

5^e lot de 14 souris, dont 7 inoculées avec la souche EV40 (Aquæ) : agglutinations négatives ;

6^e lot de 14 souris, dont 7 inoculées avec la souche Sek. (Aquæ) : agglutinations négatives ;

Ainsi nous n'avons pas une seule fois noté la moindre agglutination de ces 2 souches de mycob. atypiques hétérologues.

Que penser de la négativité de ces expériences ? D'abord, nous ne pouvons savoir si les souches utilisées étaient en phase agglutinable ou non ; de même on ne connaît pas les conditions optima pour activer les agglutinines du sérum ; enfin, les réactions peu spécifiques que nous avons obtenues peuvent s'expliquer par quelques antigènes communs, parmi les matériaux antigéniques des différentes mycobactéries pathogènes et saprophytes ; et l'épreuve de saturation des agglutinines nous permet de préciser qu'il ne s'agit que d'une similitude et non d'une identité antigénique.

CHAPITRE IV

LA LYSOTYPIC

1. Rappel théorique

La lysogénie fut observée dès 1922 ; Gardner et Weiser en 1947 découvrent le premier bactériophage actif sur une mycobactérie ; Hauduroy et Rosset en 1948, Whittaker en 1950, Mac Laren puis Hnatk en 1951 en ont isolés plusieurs autres ; enfin Penso et Ortali isolèrent un grand nombre de phages actifs sur les bacilles paratuberculeux, et essayèrent de les utiliser pour classer les mycobactéries par lysotypie.

On sait que la spécificité d'un phage est commandée par la présence à la surface de la bactérie, de certains polysaccharides doués de propriétés antigéniques. Le mécanisme de la lysogénie a pu être étudié à partir de 1953, par Lwoff : lorsqu'un bactériophage a injecté son matériel génétique à une bactérie sensible, au lieu de se multiplier, de la lyser et de libérer des parties infectieuses, il peut y rester intégré à l'état de prophage, laissant la bactérie vivante mais enrichie du génome du phage ; celui-ci se divisera dans le génome de l'hôte en donnant naissance à des cellules lysogènes qui transmettront à leur descendance la propriété de produire les particules de phage sans infection ultérieure. Mais seuls les bactériophages « tempérés » sont capables d'induire la lysogénisation de bactéries sensibles. Il y a un prophage par noyau bactérien, donc un nombre limité de prophages par bactéries lysogènes, et ces prophages sont fixés par des structures spécifiques. L'hypothèse

la plus simple est que le prophage est une unité nucléaire, et qu'il est le seul déterminant génétique de la lysogénie. Par l'analyse génétique, on a pu le localiser sur le chromosome de la bactérie-hôte, et chaque type de prophage a sa localisation propre.

2. Obtention et isolement des phages

Pour l'obtention du phage, selon la technique de Penso (Raynaud J.-P., thèse vétérin., Lyon, 1954), on prend de la terre avoisinant du fumier, dont on filtre sa moitié d'eau; les gouttes sont disposées au centre des cultures mycobactériennes sur gélose : les plages de cultures lysées sont alors recueillies, broyées, filtrées : alors le phage sera individualisé sur sérum de lapin antiphage, par les méthodes de déviation croisée : on isole ainsi des phages portant les noms des souches bactériennes.

Les méthodes d'enrichissement des sols en mycobactériophages sont variées : Vandra et Gal utilisent une variante de la méthode de Gardner et Weiser. Ilsensemencèrent 28 échantillons de sols, dont 5 contenaient des mycobactériophages, avec des cultures en bouillon glycérimé et lavé au sérum physiologique, ceci deux fois par semaine durant 4 à 6 semaines. Les liquides furent décantés, filtrés sur gaze, puis filtré sur G5 ; des gouttes de filtrats sont déposées à la surface de plaques de gélose ensemencées avec des cultures glycérimées de mycobactéries, et incubées à 37° C pendant 2 jours.

Selon la technique de Hauduroy, l'échantillon de sol est additionné de bouillon glycérimé, incubé à 37° pendant 45 heures, et filtré sur gaze et G5 ; ce filtrat est enrichi des cultures glycérimées de bacilles, et laissé 3 jours à 37° ; on filtre à nouveau et on répète 4 ou 5 fois la même opération.

On obtient alors parfois une inhibition complète de la croissance de certaines mycobactéries. Tous les phages obtenus sont inactivés par chauffage à 75°, durant 5 à 10 minutes.

3. Classifications par lysotypie

Penso et Orтали s'étaient proposés d'établir une méthode de lysotypie pour les mycobactéries. Mais la classification par lysotypie ne concorde pas entièrement avec celles fondées

sur les caractères morphologiques, sérologiques et biochimiques ; il y a cependant des similitudes frappantes : *Mycob.*, *smegmatis* et *phlei* sont les espèces les plus sensibles ; et plus les espèces sont chromogènes, plus elles sont résistantes. La découverte de deux phages actifs sur des souches virulentes de bacille de Koch offre un champ de recherche extrêmement prometteur pour la classification, la structure, la physiologie et l'immunologie de ces bactéries acido-résistantes.

Pour réaliser ce phage-typing, 3 ans plus tard en 1956, Hnatko S.I. s'est adressé à un ensemble de bactériophages connus actifs et spécifiques de diverses mycobactéries non pathogènes. Utilisant une technique originale de lysotypie, il a comparé 33 souches de mycobactéries dépourvues de pouvoir pathogène pour le cobaye : 73 % furent typées, ce qui représentait 93 % de cultures, de lavage gastrique, 75 % de celles isolées dans les urines et 29 % de celles provenant de l'expectoration. La majorité de ces souches avaient le même comportement bactériophagique que *mycob. Smegmatis* ; aucune n'était sensible aux phages spécifiques de *mycob. Phlei*.

On relève d'autres tentatives de lysotypie : en 1959, Vandra et Gal isolent à partir d'échantillons de sols, des phages qui ne sont actifs que sur des souches, qui furent respectivement utilisées pour leur isolement et leur régénération (*M. minetti*, *M. smegmatis*, *M. phlei*).

Froman et Will isolèrent 4 phages actifs sur des souches humaines et bovines de *mycob. tuberculosis* ; l'action de ces 4 phages a été recherchée sur 231 souches de bacilles tuberculeux, où 192 se sont révélés sensibles.

Takeya et Zinnaka en 1960 examinèrent les susceptibilités aux phages de 10 souches de mycobactéries atypiques : 5 souches avec des colonies R montrèrent une même susceptibilité avec les phages des souches humaines ; les 4 autres souches du type S seront résistantes aux phages en question.

Notons que Russel R.-L. rechercha sans les trouver, des modifications induites par les phages dans les réactions de culture ou les réactions biochimiques parmi les souches lysogénisées. En effet, on pourrait penser avec Tarshis M.-S., que

des bacilles virulents puissent se transformer en mycobactéries avirulentes, comme on en obtient par culture sur certains milieux.

Ceci rejoindrait l'opinion de Xalabarder C. d'une unité philogénétique de toutes les mycobactéries, qui constitueraient un groupe unique d'organismes, présentant divers degrés de changements possibles et progressifs. Le stade final et le mieux défini serait représenté par les souches pathogènes, qui ont perdu beaucoup de leurs propriétés biologiques, mais qui sont devenus toxiques pour les animaux sensibles.

Pour nous, il n'a pas été possible d'étudier la lysotypie, faute de l'organisation nécessaire et de possibilités pour ces recherches délicates.

En définitive, cette méthode d'identification et de classification s'avère la plus précise et la plus sûre ; mais elle n'est pas encore bien développée actuellement pour les mycobactéries.

CONCLUSIONS

Dans le service des Mycobactéries de l'Institut Pasteur de Lyon, il a été étudié un certain nombre de mycobactéries atypiques :

1° Parmi elles, 3 isolées de sujets atteints de pneumopathie chronique à mycobactéries atypiques, correspondant à *mycobacterium Kansasii*, et 2 isolées de suppuration ganglionnaire d'enfants, correspondant à *mycobacterium Aquæ*, type I.

2° Inoculés au cobaye, ces germes ne donnent pas de tuberculose expérimentale, mais parfois au point d'inoculation intradermique apparaît une petite caséification locale. Dans un nombre de cas important, les cobayes inoculés deviennent allergiques à la tuberculine, et répondent positivement à l'injection intradermique de mycobactéries tuées par la chaleur ; ils sont aussi allergiques aux paratuberculines sécrétées.

3° Les souches les plus allergisantes semblent être celles qui correspondent à *mycobacterium Kansasii* ; celles qui correspondent au groupe *Mycobacterium Aquæ* le sont moins. Il est difficile d'édicter des règles précises, car cette allergie est très variable selon la souche injectée à l'animal et selon la souche qui a servi à préparer la tuberculine, ou qui a fourni le bacille-test ; en effet, il semble qu'il y ait de grandes divergences dans l'aptitude des diverses souches à sécréter la tuberculine.

4° Le sérum de tuberculeux pulmonaires, de sujets atteints d'affections à mycobactéries atypiques, et d'animaux injectés avec des mycobactéries diverses, agglutine de façon variable

les souches de mycobactéries atypiques, et de bacilles tuberculeux homogènes ; nous notons cette possibilité sans qu'il soit possible de préciser la nature exacte des agglutinines. Il semble que les souches de l'espèce mycobacterium *Kansasii* se rapprochent le plus des souches de bacilles tuberculeux et des souches homogènes.

5° Des souris infectées avec des mycobactéries atypiques puis inoculées par injection intra-péritonéale avec du liquide d'ascite sarcomateuse d'Erlich, ont présenté dans les conditions normales une ascite ; dans le liquide d'ascite nous n'avons pas pu mettre en évidence d'agglutinines vis-à-vis des souches homogènes ou des mycobactéries atypiques.

6° Il existe toute une série d'antigènes communs au groupe *Mycobacterium* ; les études immuno-électrophorétiques actuelles doivent permettre une classification plus précise de ces germes, et en particulier des souches isolées de l'homme et des animaux placés à l'heure actuelle dans le groupe d'attente des Mycobactéries dites « atypiques ».

Vu, *Le Doyen* :
H. HERMANN.

Le Président de Thèse :
Professeur P. GIRARD.

Vu et permis d'imprimer Lyon, le 12 novembre 1962

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université
P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

- ALEXA (Mme. E.). — *Ann. Inst. Past.* 1928, 42, 1366.
- ARLOING (S.) et COURMONT (P.). — *Bull. Acad. Méd.* 1947, n° 25, 131, pp. 499-507.
- BECK (A.). — *J. of Pathol. and Bact.*, 1960, 79, 285.
— *J. of Pathol. and Bact.*, 1961, 82, 45.
— *J. Pathol. Bacteriol. G. B.*, 1961, 81, n° 1, pp. 45-51.
— *J. of pathol. and bacter.*, 1961, 83, 45.
- CASTELNUOVO (G.), GAUDIANO (A.), MORELLINI (M.). — *R. C. Ist. Sup. Sanita*, 1960, 23, pp. 1222-1233.
— *Ann. Ist. Carlo Forlanini*, 1959, 19-1.
- COURTOIS (P.). — Recherches sur les qualités immunisantes anti-tuberculeuses d'un bacille acido-résistant avirulent. *Thèse vétérin.* Lyon, 1957.
- DEVULDER (B.). — Les infections humaines à Mycobactéries dites atypiques. *Thèse médecine* Lille, 1962.
- DUFOUR (A.) et BRUN (J.). — *Traité de Phtisiologie clinique*. Edit. Vigot, Paris, 1933, pp. 44-91.
- DUMAS (J.). — *Bactériologie médicale*, Edit. Flammarion à révision annuelle, pp. 223.
- EDWARD (L.-B.) et PALMER (C.-E.). — *Americ. J. of Hygiene*, 1958, 68, 213.
— *Amer. J. of Hygiene*, 1957, 66, 253.
- FERNANDEZ-RUIZ, DELGADO-BLANCO, ILUKEVITCH. — *Mycopath. Mycol. appl. Pays-Bas*, 1961, 15, 258.
- FÖLDER (J.). — *Acta Microbiol. Acad. Sci. hungar.*, 1961, 8-2, 115.
- FRIECKSEN et LAUTERBACH. — *Zentralblatt. Bakt.*, 1960, 180, 217.
- FROMAN et BOGEN (E.). — *Trans. 49th Ann. Meet. nat. Tuberc. Assoc.*, 1953, 6-3.

- FROMAN (S.) et WILL (D.-W.). — *Amer. J. Publ. Health*, 1954, 44, 1326.
- GARDNER et WEISER. — *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.*, 1947, 66, 206.
- HAUDUROY (P.). — Inventaire et description des bacilles paratuberculeux. *Ed. Masson*, 1946.
- Des mycobactéries anormales et de leur rapport avec la pathologie humaine. *Rev. Immunologie Paris*, 1960, 24, 24, pp. 606-614.
- HIRANO (N.) et SUSHIKA (K.). — *Jap. J. Microbiol.*, 1961, 4, n° 3, 303.
- HNATKO (S.-I.). — *Canad. J. Microbiol.*, 1956, 2, 39.
- HUTINEL (P.). — Contribution à l'étude des caractères distinctifs des mycob. non pathogènes. *Thèse Méd. Lyon*, 1954.
- LAGERCRANTZ (R.). — *Acta path. Microbiol. Scand.*, 1956, 38, 416.
- *Acta path. Microbiol. Scand.*, 1956, 38, 492.
- LAPORTE (R.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1941, 62, 284.
- LIND (A.). — *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, 1960, 17, pp. 300-322.
- LURIDIANA (N.), GANZETTI (G.-L.), GRASSI (F.) et STRINGA (C.). — *G. Ital. Tuberc.*, 1961, 15, 3.
- LURIDIANA (N.). — *G. Ital. Tuberc.*, 1961, 15, 65.
- MAC CUISTON (C.-F.). — *Amer. Rev. of Respir. Dis.*, 1960, 82, 2.
- MAGNUSSON (M.), ENGBAECK (M.-C.) et BENTZON (M.-W.). — *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1961, 83, pp. 57-84.
- MANIGAULT (P.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, 97, 752.
- MANKIEWICZ (E.). — *Canada J. Microbiol.*, 1958, 4, 565.
- MERKAL (R.-S.) et LARSEN (A.-B.). — *Amer. Rev. of tuberc.*, 1958, 77, 177.
- NASSAU (E.) et SCHWABACHER (H.). — *Amer. Rev. of Tuberc.*, 1958, 72-2, 109.
- PARLETT (R.) et YOUMANS (G.-P.). — *Amer. Rev. Tuberc.*, 1956, 73-1, 637.
- *Amer. Rev. tub.*, 1958, 77, 462.
- PARLETT (R.-C.). — *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1961, 84, 589.
- *Int. J. Leprosy*, 1960, 28, 300.

- PATTERSON (D.-S.) et PATTERSON (A.-B.). — *J. Comp. Path.*, 1959, 69, 65.
- PENSO (G.). — *Premier Colloque Intern. sur les Mycob.*, édit. Janssens, 1959.
- RAYNAUD (J.-P.). — *Thèse Vétérin. Lyon*, 1954.
- ROTACH (F.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, 71.
- RUNYON (E.-H.). — *Bull. Un. Int. contre la tuberc.*, 1959, 29, 72.
- RUSSEL (R.-L.). — *Amer. Rev. of Tuberc.*, 1960, 82-2, 384.
- SCHAEFFER (W.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1937, 58, 388.
- SCHWABACHER (H.). — *J. of Hyg. (Lond.)*, 1959, 57-2, 57.
- TACQUET et TISON. — *Sem. Pathol. Biol. Fr.*, 1961, n° 9-10, 1185.
- TACQUET (A.), TISON (F.), MACQUET (V.). — Techniques récentes d'identification des mycobactéries. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1958-59, 10, pp. 223-230.
- TAKEYA (K.) et ZINNAKA. — *Amer. Rev. of Respir. Dis.*, 1960, 81, 674.
- TAKAHASHI (Y.), FUJITA (S.) et SASAKI (A.). — *J. of Exp. Med.*, 1961, 113, pp. 1141-1154.
- TARSHIS (M.-S.). — *Amer. Rev. of Tuberc.*, 1958, 78, 921.
- THURSTON (J.-R.) et RHEIMS (M.). — *Amer. Rev. of Tuberc.*, 1956, 73, pp. 563-571.
- VANDRA (E.) et GALL (F.). — *Bull. Inst. Pasteur*, 1959, 57, 1637.
- VIALLIER, AUGAGNEUR. — Test de la Nyacine et identification des mycobactéries. *Rev. Franç. Et. clin. biol.*, 1961, n° 5, pp. 500-505.
- VIALLIER (J.), DESPIERRES (C.), et CAYRÊ (R.-M.). — *La Presse Médicale*, 1959, 67, 1508.
- VILLANOVE (J.-B.). — Valeur du test à la Nyacine pour l'identification des mycobactéries. *Thèse Méd. Lyon* 1961.
- VISTANEN (S.). — *Acta Tuberc. Scand.*, 1961, 40, n° 3, pp. 175-181.
- WIJMULLER (G.). — *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1961, 83, pp. 815-825.
- XALABARDER (C.). — *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1961, 83, 115.
-

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE PREMIER. — Introduction	15
1° Définition	15
2° Historique	16
3° Méthodes directes d'identification et classifications	17
4° Les antigènes des Mycobactéries	22
CHAPITRE II. — L'allergie de type tuberculinique	23
1° Les Paratuberculines et leur spécificité	23
2° Notre expérimentation	27
CHAPITRE III. — Les réactions sérologiques	35
1° Séro-agglutination	35
2° Fixation du complément	36
3° Hémagglutination et Hémolyse	37
4° Immuno-électrophorèse	40
5° Notre expérimentation de séro-agglutination	43
CHAPITRE IV. — La Lysotypie	49
1° Rappel théorique	49
2° Isolement des phages	50
3° Notions de lysotypie des Mycobactéries	50
Conclusions	53
Bibliographie	55
